



¹ ECBio - Investigação e Desenvolvimento em Biotecnologia S.A., R. Henrique Paiva Couceiro, 27, 2700-451 Amadora

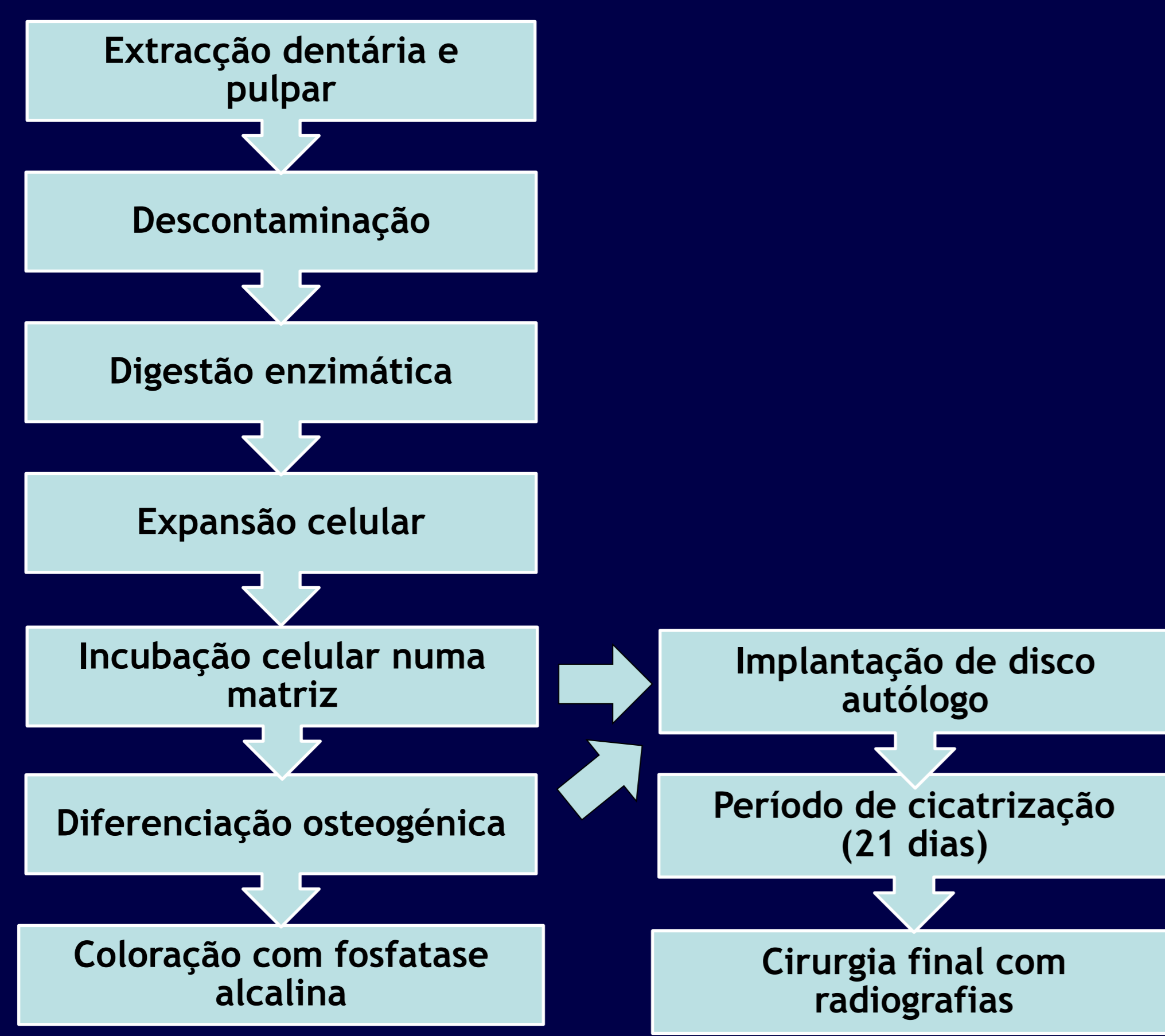
² Hospital Universitário Santa Maria, Serviço de Estomatologia, Avenida Professor Egas Moniz, 1649-035 Lisboa



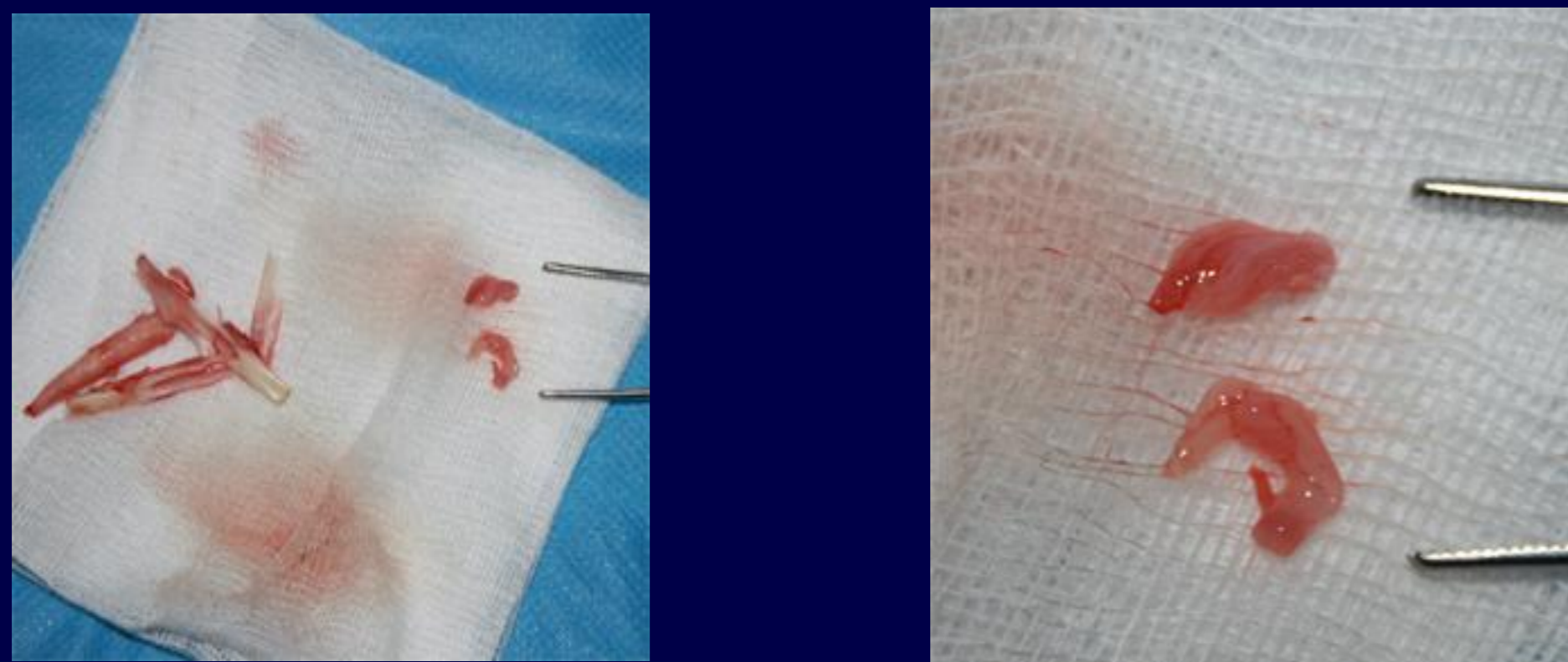
Objectivos

As Células Estaminais Mesenquimais (MSCs) encontram-se presentes em vários tecidos do indivíduo adulto, incluindo os tecidos dentários. Neste trabalho de investigação conseguimos isolar, multiplicar e criopreservar as MSCs da polpa dentária porcina, de incisivos mandibulares, cuja acessibilidade é mais simples. O objetivo era a utilização destas MSCs no meio clínico para a regeneração óssea autóloga.

Materiais e Métodos



Cirurgia de Extracção pulpar



➔ A polpa dentária foi recolhida de incisivos porcinos no Centro de Cirurgia Experimental do Hospital Santa Maria em colaboração com o Serviço de Estomatologia do Centro Hospitalar Lisboa Norte, colocada numa solução descontaminada e digerida num processo laboratorial otimizado

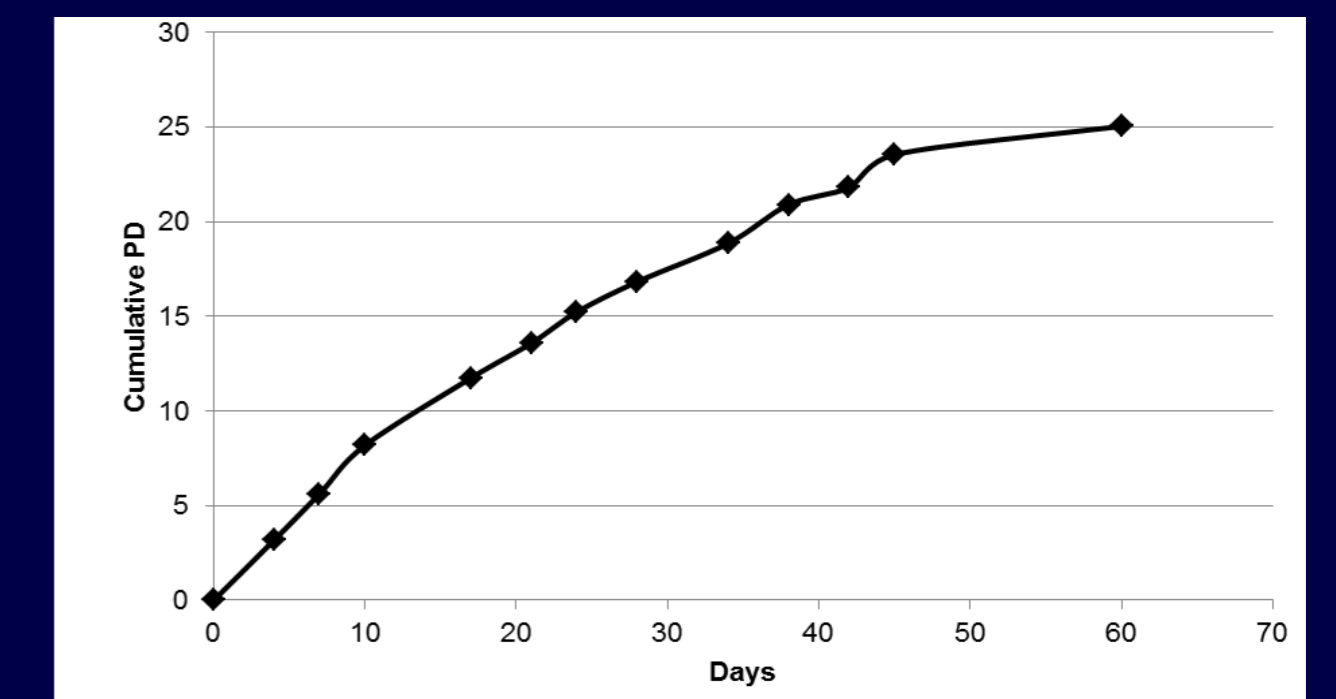
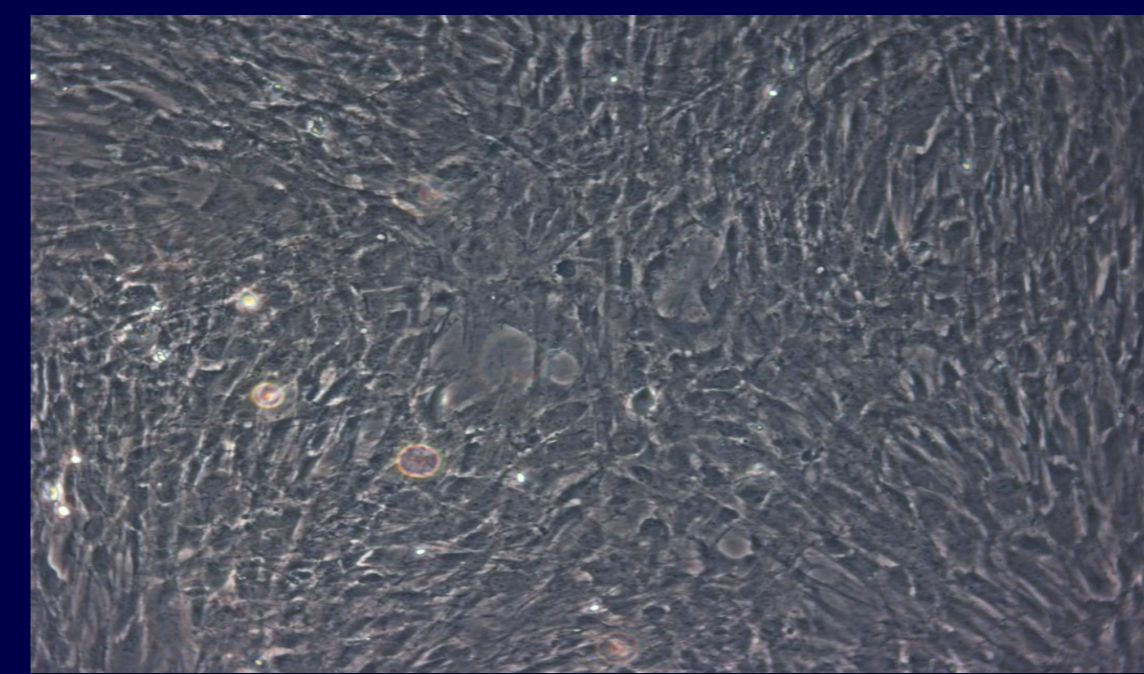
Isolamento Celular

Informação sumária do isolamento da polpa dentária porcina

Contaminações	1/16
Eficácia na extracção de MSCs	16/16
Dias a partir do isolamento a P0	5 ± 1.8
Total de céls. no P0 / dente	8.2x 10 ⁵ ± 4.4x 10 ⁵
Dias a partir do isolamento a P1	10 ± 3
Total de céls. no P1 / dente	4x 10 ⁶ ± 3 x 10 ⁶

➔ Extraíram-se MSCs da polpa dentária com poucas contaminações (a pesar da grande carga bacteriana conhecida da mucosa oral) com uma eficácia de 100%.

Expansão celular



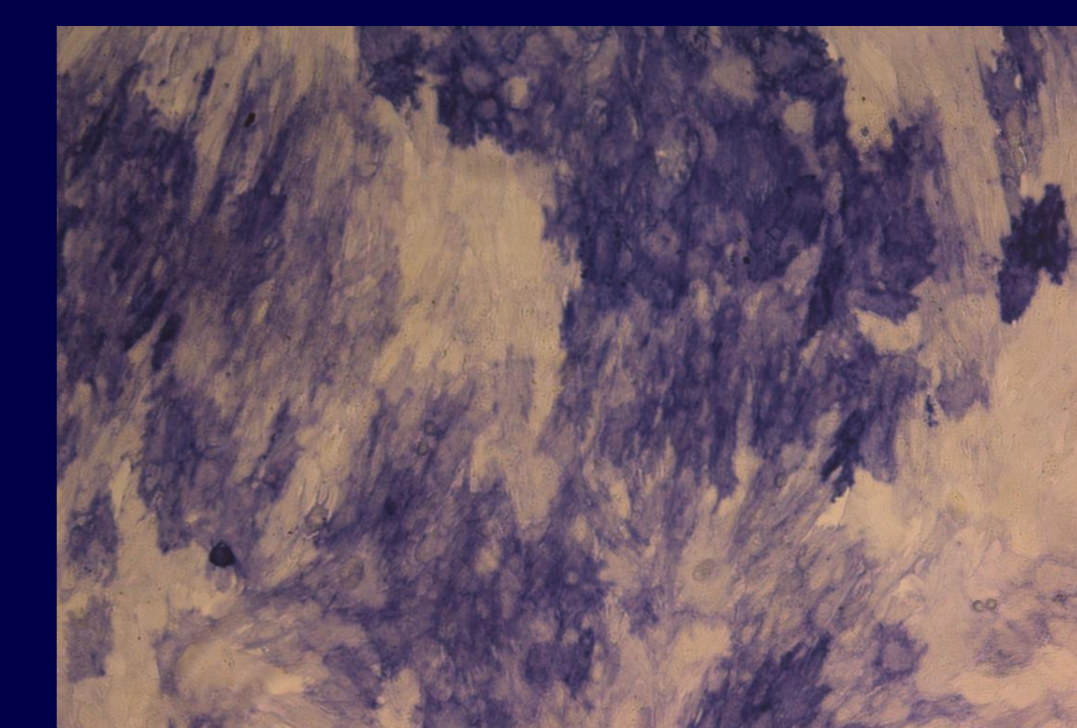
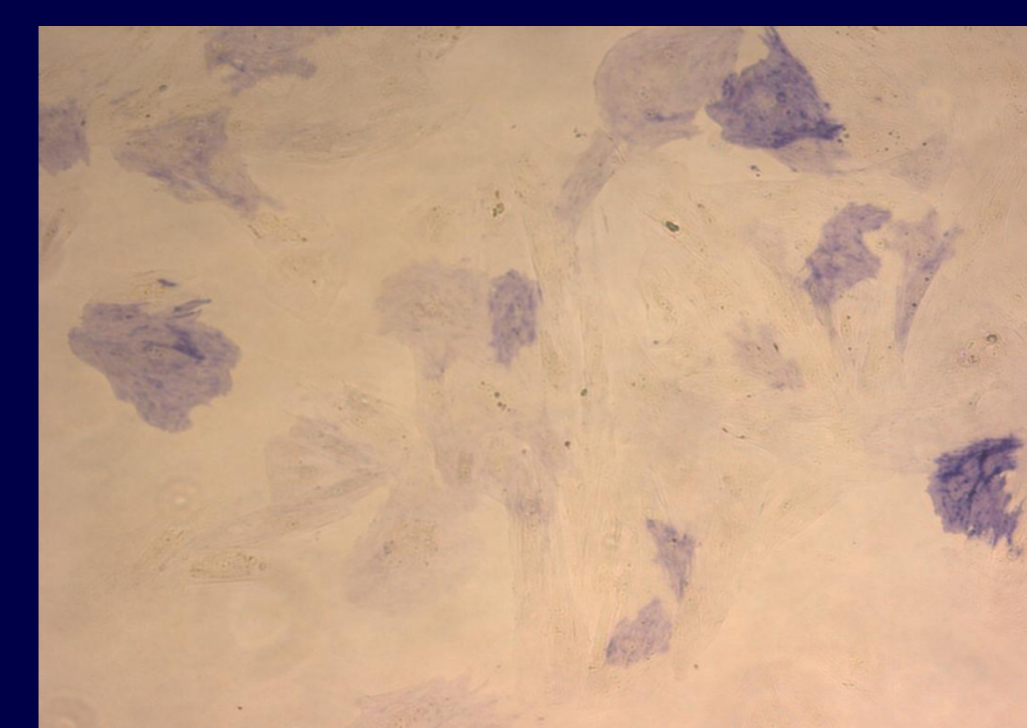
➔ As células isoladas eram plastic-adherent e exibiam uma morfologia semelhante a fibroblastos em toda a cultura celular, tal como esperado para MSCs. As células podem estar em cultura, pelo menos 2 meses, excedendo os 25 doublings populacionais, e mesmo a passagens maiores a taxa de crescimento permanece elevada.

Resultados e Discussão

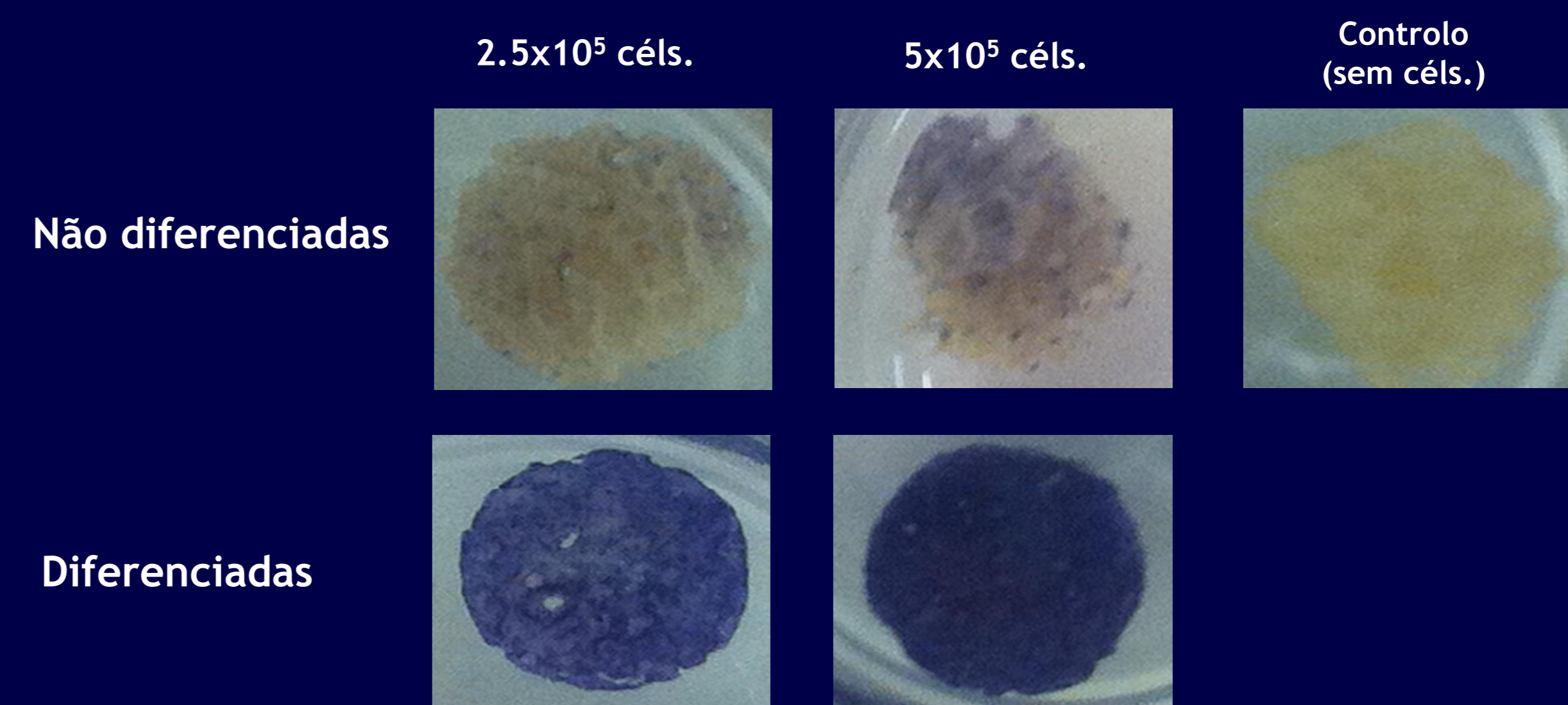
Diferenciação osteogénica

Controlo

Diferenciadas

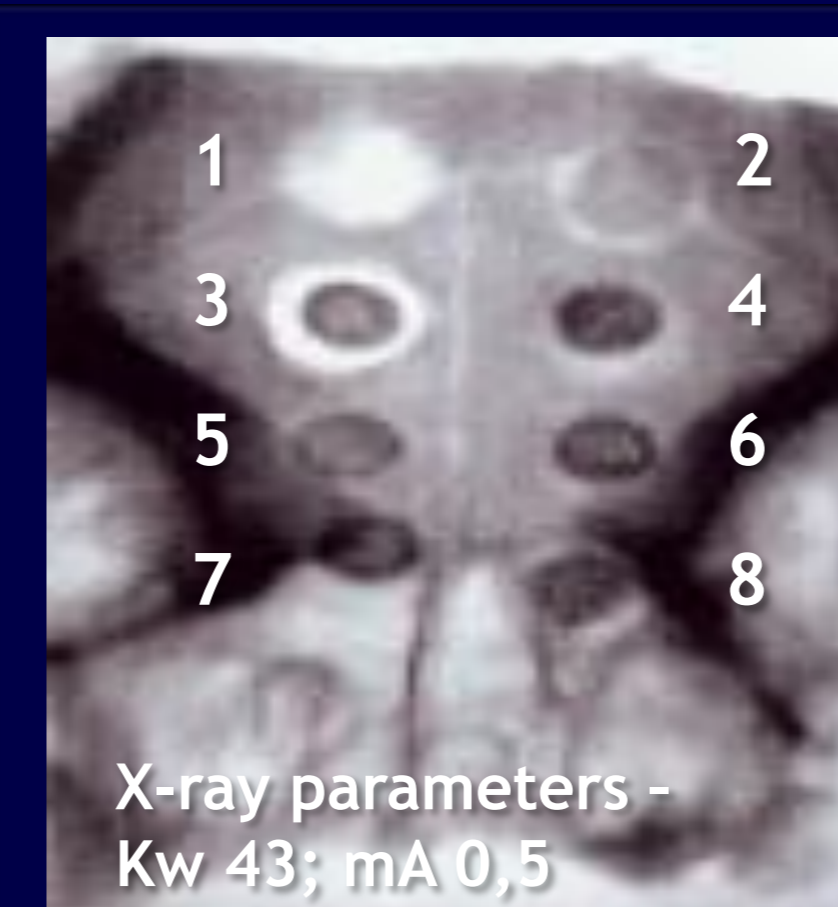


➔ As MSCs dentários porcinos sofreram diferenciação osteogénica após 1 semana de cultura no meio de diferenciação osteogénica detectada pela presença de fosfatase alcalina (coloração violeta).

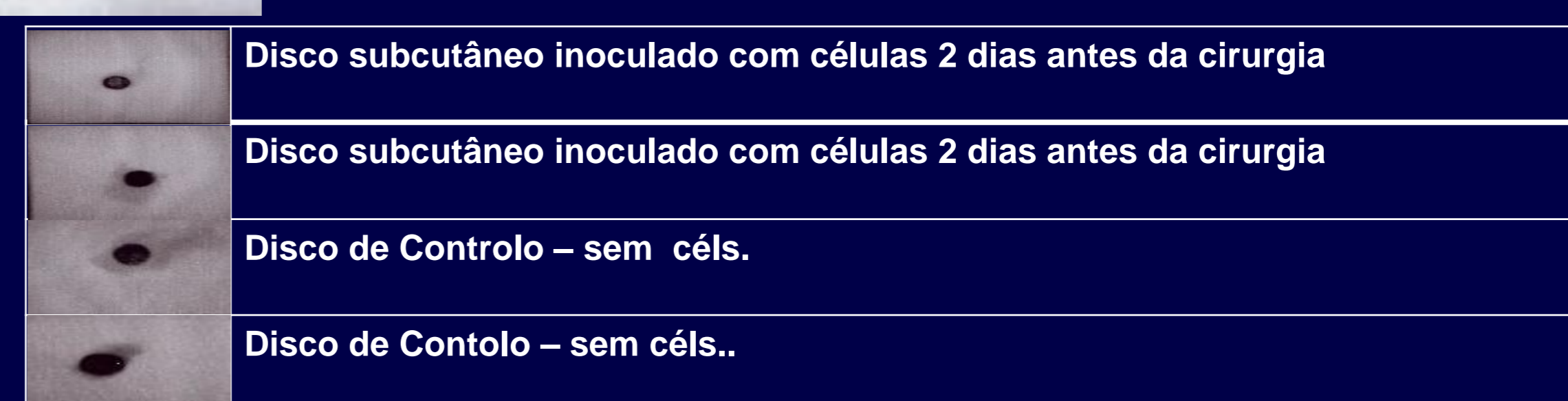


➔ As MSCs foram incubadas numa matriz (adbone[®] TCP, MedBone[®]) e aderiram na presença ou ausência do meio de diferenciação osteogénica por 1 semana. A coloração da fosfatase alcalina demonstrou que as células aderiram à matriz e eram capazes de sofrer diferenciação osteogénica na própria matriz.

Resultados Radiográficos



1	Controlo negativo
2	Ossó autólogo (controlo positivo – gold standard)
3	Controlo – disco sem células
4	Controlo – disco sem células
5	Disco com células não diferenciadas incubadas 7 dias antes
6	Disco com células não diferenciadas incubadas 7 dias antes
7	Disco com células diferenciadas inoculadas 7 dias antes e meio de dif.
8	Disco com células diferenciadas inoculadas 7 dias antes e meio de dif.



➔ A regeneração óssea *in vivo* bone resulta baseado no que o Rx nos transmite indica que a formação de osteóide e mineralização está presente comparando com o defeito ósseo vazio.

Conclusões

Otimizou-se um método para isolar e fazer a cultura das células da polpa dentária porcina. Em poucas passagens celulares obtivemos células suficientes para as utilizar no estudo clínico. As células aderidas ao biomaterial foram utilizadas para tratar os defeitos ósseos cranianos do modelo porcino com sucesso. Através da análise de Raio-X obtida após a extração de amostras dos defeitos cranianos porcinos e de localizações à distância sub-dermais mostram que a regeneração óssea é acelerada na presença das MSCs obtidas da polpa dentária e que há formação de osso.